



PATENT  
Attorney Docket No. OEH-001  
(10081/2)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT(S): Czerney *et al.*  
SERIAL NO.: 10/732,928 GROUP NO.: Not yet assigned  
FILING DATE: December 10, 2003 EXAMINER: Not yet assigned  
TITLE: Benzopyrrolo-Polymethine-Based Hydrophilic Makers

Mail Stop Non-Fee Amendment  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT  
UNDER 37 C.F.R. §1.55(a)

In accordance with 37 C.F.R. §1.55(a), Applicants submit a certified copy of the following priority application to which Applicants claim foreign priority under 35 C.F.R. §119(a).

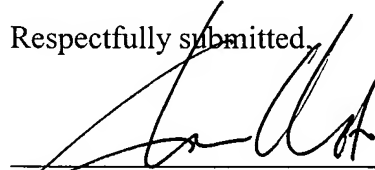
<u>Country</u>	<u>Application Number</u>	<u>Filing Date</u>
Germany	DE 102 58 150.9	December 10, 2002

Applicants believe no fee is due for this submission. However, if a fee is due in connection with this submission, the Commissioner is authorized to charge such fee to Deposit Account No. 20-0531.

Date: February 17, 2004  
Reg. No. 39,061

Tel. No.: (617) 248-7368  
Fax No.: (617) 248-7100  
3022039

Respectfully submitted,

  
Christine C. Vito  
Attorney for Applicants  
Testa, Hurwitz, & Thibeault, LLP  
High Street Tower  
125 High Street  
Boston, Massachusetts 02110



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 58 150.9

**Anmeldetag:** 10. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:** Dyomics GmbH,  
07745 Jena/DE

**Bezeichnung:** Hydrophile Marker auf der Basis von  
Benzopyrrolo-Polymethinen

**IPC:** C 09 B, A 61 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Januar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wallner

~~Doppelstück~~



102 58

EINGEGANGEN

10. Dez. 1988

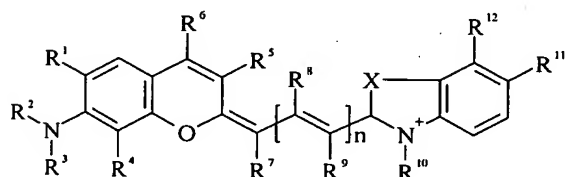
43

## Hydrophile Marker auf der Basis von Benzopyrilo-Polymethinen

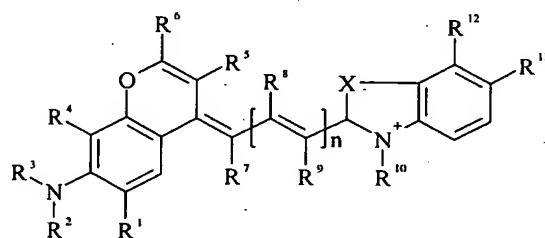
Die Erfindung betrifft Marker auf der Basis von Benzopyrilo-Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren, beispielsweise in der Medizin, in der Pharmazie sowie in der Bio-, Material- und Umweltwissenschaft.

Aufgabe war es, Fluoreszenzmarker auf Polymethinbasis mit hoher Hydrophilie, mit großen Extinktionskoeffizienten sowie hoher Photo- und Lagerstabilität zu schaffen. Diese können auf einfache Weise durch monochromatisches (Laser/Laserdioden) bzw. polychromatisches Licht (Weißlichtquellen) im UV-, im sichtbaren bzw. im NIR-Spektralbereich zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden bzw. funktionieren als Quencher.

Erfindungsgemäß werden dazu Chromophore auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formel I und II



I



II

eingesetzt.

Die Erfindung betrifft als Marker geeignete hydrophile Verbindungen auf der Basis von unsymmetrischen Polymethinen und ihre Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen Bestimmungs- und Nachweisverfahren.

Typische Verfahrensanwendungen beruhen auf der Reaktion von farbstoffmarkierten Biomolekülen, wie zum Beispiel Antigenen, Antikörpern oder DNA-Segmenten mit der jeweils komplementären Spezies. Damit werden unter anderem Messungen von Enzymkinetiken, Rezeptor-Ligand-Interaktionen und Nucleinsäure-Hybridisierungskinetiken *in vitro* als auch *in vivo* ermöglicht. Des weiteren sind die beanspruchten Marker für die pharmakologische Charakterisierung von Rezeptoren oder Wirkstoffen interessant.

Einsatzmöglichkeiten ergeben sich dadurch beispielsweise in der Medizin und Pharmazie, in der Bio- und Materialwissenschaft, bei der Umweltkontrolle und dem Nachweis von in der Natur und Technik vorkommenden organischen und anorganischen Mikroproben sowie anderes mehr.

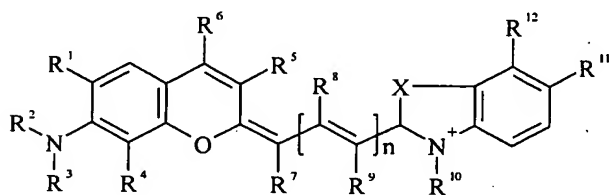
Für diese Anwendungen werden üblicherweise symmetrische Xanthylium-Salze (Fluoresceine und Rhodamine) oder Polymethine (Indocyanine), wie sie beispielsweise in der US-Patentschrift 5 627 027 beansprucht werden, verwendet.

Alle diese Marker haben den Nachteil, dass sie aufgrund der Planarität des  $\pi$ -Elektronensystems zur Aggregation und Dimerenbildung, insbesondere in wässrigen Systemen neigen. Desweiteren gehen ungenügend hydrophile Marker nicht spezifische Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Oberflächen ein, was zu Problemen bei der Aufreinigung der entsprechenden Konjugate und zur einem nicht befriedigenden Signal/Rausch Verhältnis führt.

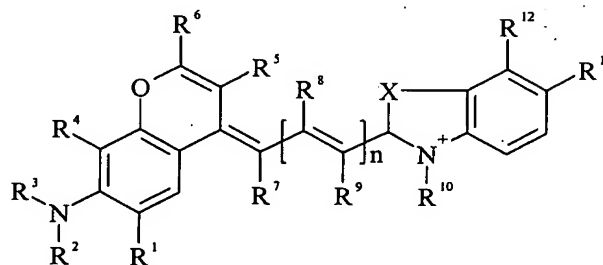
Um diese Nachteile zu umgehen, wurden in den Patentschriften PCT/DE 00/00802 und PCT/DE 01/01946 entsprechende nichtsymmetrische Polymethine auf der Basis von Benzo[b]pyran-2-yliden bzw. Benzo[b]pyran-4-yliden -Verbindungen beschrieben.

Uns gelang es nun, diese Marker durch die Einführung zusätzlicher, die Hydrophilie der Marker steigernde Substituenten weiter zu verbessern

Gegenstand der Erfindung sind nun neue hydrophiles Marker auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formeln I und II,



I



II

wobei

- X für ein Element aus der Gruppe O, S, Se, Te bzw. das Strukturelement  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{13}\text{R}^{14}$ , steht,
- $\text{R}^1 - \text{R}^{14}$  gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, Alkyl-, *tert*-Alkyl, Aryl-, Carboxyaryl-, Dicarboxyaryl, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Alkyloxy-, Alkylmercapto- (wobei die Begriffe Alkyl und Cycloalkyl auch Reste mit olefinischen Bindungen einschließen sollen), Aryloxy-, Arylmercapto-, Heteroaryloxy-, Heteroarylmercapto-, Hydroxy-, Nitro- oder Cyano-Reste sein können und  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^9$  und  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{R}^{11}$  und  $\text{R}^{12}$  bzw.  $\text{R}^{12}$  und  $\text{R}^{13}$  einen oder mehrere aliphatische, heteroaliphatische oder aromatische Ringe bilden können,
- einer oder mehrere der Substituenten  $\text{R}^1 - \text{R}^{14}$  solubilisierende bzw. ionisierbare bzw. ionisierte Substituenten wie  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ , OH,  $\text{NR}_3^+$ , Cyclodextrin oder Zucker darstellen können, die die hydrophilen Eigenschaften der Farbstoffe bestimmen, wobei diese Substituenten auch über eine aliphatische oder heteroaliphatische, gegebenenfalls zyklische Spacergruppe am eigentlichen Grundchromophor angebunden sein können,

- mindestens einer der Substituenten  $R^1 - R^{14}$  für eine reaktive Gruppe vom Typ Isocyanat, Isothiocyanat, Hydrazin, Amin, Mono- und Dichlor- bzw. Mono- und Dibromtriazin, Aziridin, Sulfonylhalogenid, *N*-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd bzw. Maleimid oder Iodacetamid sowie Phosphoramidit steht, wobei der jeweilige Substituent über eine aliphatische oder heteroaliphatische, gegebenenfalls zyklische Spacergruppe am eigentlichen Grundchromophor angebunden sein kann,
- die aliphatische oder heteroaliphatische Spacergruppe aus einem Strukturelement  $-[(CH_2)_a-Y-(CH_2)_b]_c-$  besteht, worin Y gleich oder verschieden eine  $CR_2-$ , O-, S-,  $SO_2$ ,  $SO_2NH-$ , NR-, COO- oder CONR- Funktion sein kann, wobei R die Funktionen von  $R^1 - R^{14}$  einnehmen kann und a und b gleich oder verschieden die Werte von 0 - 18 und c die Werte von 1- 18 darstellen,
- n für die Zahlenwerte 0, 1, 2 oder 3 steht, wobei die für  $n = 2$  oder 3 jeweilig doppelt oder dreifach vorkommenden Substituenten  $R^8$  und  $R^9$  gleich oder unterschiedlich sein können,

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können als Farbstoffe zur optischen Markierung von Proteinen, Nukleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Liganden, Rezeptoren, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln verwendet werden und als Farbstoffe in Systemen zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von Proteinen,

Nukleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln über die funktionellen Gruppen an eine HO-,  $H_2N-$ , HS- oder  $HO_2C$ -Funktion der zu bestimmenden Substanzen gekoppelt werden.

Diese Kopplungsreaktion wird vorteilhaft in organischen oder wäßrigen Lösungen durchgeführt.

Die aus den erfindungsgemäßen Verbindungen und Biomolekülen bestehenden Konjugate weisen fluoreszierende Eigenschaften auf bzw. deaktivieren den angeregten Zustand ohne Abgabe von Licht (Quencher).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen finden in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren einschließlich Immuntests, Hybridisierungsverfahren, chromatographischen oder elektrophoretischen Verfahren, FRET-Systemen und Hoch-Durchsatz-Screenings oder zur Analyse von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen auf einem Mikroarray Verwendung.

Die Polymethine der allgemeinen Formeln I und/oder II können als Farbstoffe zur optischen Markierung von organischen oder anorganischen Erkennungseinheiten, z. B. von Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Antigenen, Haptenen, Enzymsubstraten, Enzym-Cofaktoren, Biotin, Carotinoiden, Hormonen, Neurohormonen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren, Lymphocinen, Lektinen, Toxinen, Kohlenhydraten, Oligosacchariden, Polysacchariden, Dextranen, Nucleinsäuren, Oligonucleotiden, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, rezeptorbindenden Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen polymeren Trägermaterialien verwendet werden.

Die Markierung der Erkennungseinheiten kann dabei durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und den zu markierenden Materialien erfolgen.

Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, die Erkennungseinheit oder das Trägermaterial kovalent mit dem Fluorophor zu verbinden. Diese Kopplungsreaktion kann in wäßriger oder überwiegend wäßriger Lösung und vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dabei entsteht eine Sonde (Konjugat) zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von unterschiedlichen Biomaterialien bzw. anderen organischen und anorganischen Materialien unter Benutzung optischer Verfahren.

Sowohl die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und davon abgeleitete Systeme können in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren zur Diagnostik von Zelleigenschaften (Molekulare Bildgebung), in Biosensoren (*point of care*-Messungen), zur Erforschung des Genoms und in Miniaturisierungstechnologien

eingesetzt werden. Typische Anwendungen erfolgen in der Zytometrie und Zellsortierung, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), im *Ultra-High-Throughput-Screening* (UHTS), bei der *multicolor* Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), in FRET-Systemen und in Mikroarrays (DNA- und Protein-Chips).

Dabei ist ein Mikroarray eine rasterartige Anordnung von auf mindestens einer Oberfläche immobilisierten Molekülen, die zum Studium von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen verwendet werden können. Eine rasterartige Anordnung bedeutet mehr als zwei voneinander verschiedene Moleküle, welche sich innerhalb einer Fläche befinden und dort in unterschiedlichen, vorher definierten Regionen mit bekannter Position immobilisiert sind.

Ein Rezeptor ist ein Molekül, das eine Affinität zu einem gegebenen Liganden besitzt. Rezeptoren können natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Moleküle sein. Rezeptoren können in reiner Form oder gebunden an andere Spezies eingesetzt werden. Rezeptoren können kovalent oder nichtkovalent entweder direkt oder durch bestimmte Kopplungsvermittler an einen Bindungspartner angeknüpft werden.

Beispiele für Rezeptoren, die durch diese Erfindung detektiert werden können, schließen Agonisten und Antagonisten für Zell-Membran-Rezeptoren, Toxine und andere Giftstoffe, virale Epitope, Hormone wie Opiate und Steroide, Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, als Kofaktoren agierende Wirkstoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Zellen, Zellfragmente, Gewebefragmente, Proteine und Antikörper ein, sind aber nicht auf die angeführten Stoffe beschränkt.

Ein Ligand ist ein Molekül, das von einem bestimmten Rezeptor erkannt wird. Beispiele für Liganden, die durch die erfindungsgemäßen Verbindungen detektiert werden können, schließen Agonisten und Antagonisten für Zell-Membran-Rezeptoren, Toxine und andere Giftstoffe, virale Epitope, Hormone wie Opiate und Steroide, Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, als Kofaktoren agierende Wirkstoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Nukleinsäuren,



Oligosaccharide, Proteine und Antikörper ein, sind aber nicht auf die angeführten Stoffe beschränkt.

Durch die Darstellung von nichtsymmetrischen Polymethinen, die einerseits als terminale Funktion einen leicht derivatisierbaren Heterocyclen vom Typ CH-aciden Verbindungen, andererseits einen neuartig substituierten 6-Ringheterocyclen aufweisen, werden insbesondere nachfolgende Vorteile erreicht:

Bereits relativ kleine Moleküle absorbieren im Spektralbereich über 550 nm und zeigen gegenüber den bisher bekannten Polymethinen mit Absorptionsmaxima über 650 nm (Penta- und Heptamethine) eine wesentlich verbesserte photochemische und thermische Stabilität.

Durch *molecular engineering* ist es möglich, Lage und Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima beliebig zu steuern und den Emissionswellenlängen unterschiedlicher Anregungslaser, vor allem Diodenlasern, anzupassen.



Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind relativ einfach durch das Kondensieren der beiden unterschiedlichen CH-aciden Heterocyclen und eines C-1, C-3 oder C-5 Baustein herzustellen (Eintopf-Verfahren).

Weitere Verfahren zu ihrer Herstellung bestehen darin, daß in einer 1. Reaktionsstufe einer der CH-aciden Heterocyclen mit dem C-1, C-3 oder C-5 Baustein kondensiert wird und nach Isolierung des 1:1-Kondensationsproduktes in einer nachfolgenden Kondensation mit dem zweiten CH-aciden Heterocyclen zum Polymethin umgesetzt wird. Dabei ist die Reihenfolge der Verwendung der Heterocyclen unerheblich.

Dadurch ist in wenigen Reaktionsschritten eine Vielzahl unterschiedlich funktionalisierter, stark hydrophiler Farbstoffe, die sich hinsichtlich der Gesamtladung und der Spezifität/Reaktivität der zur Immobilisierung genutzten aktivierten Gruppen unterscheiden, auf einfache Weise herstellbar.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen:

- Fig. 1:     **Synthese von DY - 615**  
          **Ausführungsbeispiel 1**
- Fig. 2:     **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 615**  
          **Ausführungsbeispiel 2**
- Fig. 3:     **Synthese von DY - 631**  
          **Ausführungsbeispiel 3**
- Fig. 4:     **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 631**  
          **Ausführungsbeispiel 4**
- Fig. 5:     **Synthese von DY - 633**  
          **Ausführungsbeispiel 5**
- Fig. 6:     **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 633**  
          **Ausführungsbeispiel 6**
-  Fig. 7:     **Synthese von DY - 636**  
          **Ausführungsbeispiel 7**
- Fig. 8:     **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 636**  
          **Ausführungsbeispiel 8**
- Fig. 9:     **Synthese von DY - 651**  
          **Ausführungsbeispiel 9**
- Fig. 10:    **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 651**  
          **Ausführungsbeispiel 10**
- Fig. 11:    **Synthese von DYQ - 661**  
          **Ausführungsbeispiel 11**
-  Fig. 12:    **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DYQ - 661**  
          **Ausführungsbeispiel 12**
- Fig. 13:    **Synthese von DY - 676**  
          **Ausführungsbeispiel 13**
- Fig. 14:    **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 676**  
          **Ausführungsbeispiel 14**
- Fig. 15:    **Synthese von DY - 731**  
          **Ausführungsbeispiel 15**
- Fig. 16:    **Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 731**  
          **Ausführungsbeispiel 16**
- Fig. 17:    **Synthese von DY - 751**  
          **Ausführungsbeispiel 17**

- Fig. 18: Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 751**  
Ausführungsbeispiel 18
- Fig. 19: Synthese von **DY - 776**  
Ausführungsbeispiel 19
- Fig. 20: Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 776**  
Ausführungsbeispiel 20
- Fig. 21: Synthese von **DY - 681**  
Ausführungsbeispiel 21
- Fig. 22: Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 681**  
Ausführungsbeispiel 22
- Fig. 23: Synthese von **DY - 701**  
Ausführungsbeispiel 23
- Fig. 24: Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 701**  
Ausführungsbeispiel 24
- Fig. 25: Synthese von **DY - 781**  
Ausführungsbeispiel 25
- Fig. 26: Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 781**  
Ausführungsbeispiel 26

Im folgenden bezieht sich der Begriff „Vakuum“ auf den Druckbereich von 30 – 150 mbar. Die Mischungsverhältnisse von Flüssigkeiten sind Volumenverhältnisse. Und RT bedeutet Raumtemperatur.

### Ausführungsbeispiele 1 – 20 (Verbindungen der allgemeinen Formel I)

#### 1. Synthese von **DY - 615**

152 mg (0.5 mmol) 7-Amino-2-*tert*-butyl-4-methyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-5-sulfonato-3*H*-indolium-Betain werden in 50 ml Acetanhydrid gelöst, mit 75 µl (0,6 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 1 ml Pyridin versetzt. Die Lösung wird bei ca. 140 °C ca. 30 min gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>-RP-18, Eluent Methanol / Wasser im Verhältnis 8 : 2).

110 mg (38 %) Ausbeute. – UV/Vis (Ethanol): – MS (ESI<sup>+</sup>): 601.1 [M + Na]<sup>+</sup>; 578.9 [M]<sup>+</sup>; 312.4 [M + 2Na]<sup>2+</sup>. – C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S (578.73).

## 2. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 615**

15 mg **DY - 615**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden in 1 ml trockenem DMF gelöst. Dann gibt man 10 µl Triethylamin zu. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei RT gerührt und anschließend filtriert. Im Anschluß daran wird das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand mit Diethylether gewaschen. Diese Reaktion verläuft quantitativ.

## 3. Synthese von **DY - 631**

180 mg (0.5 mmol) 2-*tert*-Butyl-7-diethylamino-4-methyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden in 50 ml Acetanhydrid gelöst, mit 75 µl (0.6 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 1 ml Pyridin versetzt. Die Lösung wird bei ca. 140 °C ca. 30 min gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Der Rückstand wird in einer Mischung aus 10 ml Aceton und 10 ml 2-molarer Salzsäure 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt, die Reaktionslösung mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird chromatographiert (SiO<sub>2</sub>-RP-18, Eluent Methanol/ Wasser im Verhältnis 6:4).

145 mg (39 %) Ausbeute. – UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 637 nm (185.000 l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>). – Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}}$  = 658 nm. – MS (ESI<sup>+</sup>): 713.2 [M]<sup>+</sup>; 356.4 [M - H]<sup>2+</sup>. – C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (736.88).

## 4. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 631**

15 mg **DY - 631**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

## 5. Synthese von **DY - 633**

183 mg (0.5 mmol) 2-*tert*-Butyl-7-[ethyl-(3-sulfonatopropyl)-amino]-4-methyl-chromenylium-Betain und 242 mg (0.5 mmol) 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-5-sulfonato-3*H*-indolium-Betain werden in 50 ml Acetanhydrid gelöst, mit 75 µl (0.6 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 200 mg Natriumacetat versetzt. Die Lösung wird bei ca. 140 °C ca. 30 min gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Der Rückstand wird chromatographiert (SiO<sub>2</sub>-RP-18, Eluent Methanol/ Wasser im Verhältnis 6:4).

135 mg (36 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 637 nm (180.000 l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}}$  = 657 nm. - MS (ESI<sup>-</sup>): 727 [M]<sup>-</sup>; 363.4 [M - H]<sup>2-</sup>. - C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (751.92).

#### 6. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 633**

15 mg **DY - 633**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

#### 7. Synthese von **DY - 636**

206 mg (0.5 mmol) 10-*tert*-Butyl-8-methyl-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxonia-3a-aza-benzo[*de*]anthracene-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

135 mg (36 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 645 nm (155.000 l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}}$  = 670 nm. - MS (ESI<sup>-</sup>): 737.1 [M]<sup>-</sup>; 368.4 [M-H]<sup>2-</sup>. - C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (760.91).

#### 8. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 636**

15 mg **DY - 636**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

#### 9. Synthese von **DY - 651**

206 mg (0.5 mmol) 2-*tert*-Butyl-8-ethyl-4,5,7,7-tetramethyl-7,8-dihydro-1-oxonia-8-aza-anthracen-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

145 mg (38 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 653 nm (160.000 l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}}$  = 678 nm. - MS (ESI<sup>-</sup>): 765.1 [M]<sup>-</sup>; 382.4 [M-H]<sup>2-</sup>. - C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (888.96).

#### 10. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 651**

15 mg **DY - 651**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

### 11. Synthese von DYQ - 661

196 mg (0.5 mmol) 7-Diethylamino-3,4-dimethyl-2-phenyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

145 mg (37 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 661 \text{ nm} (116.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 747.1 [M]<sup>+</sup>, 373.6 [M - H]<sup>2+</sup>. - C<sub>39</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (770.90).

### 12. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DYQ - 661

15 mg DYQ - 661, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

### 13. Synthese von DY - 676

216 mg (0.5 mmol) 8-Ethyl-4,5,7,7-tetramethyl-2-phenyl-7,8-dihydro-1-oxonia-8-aza-anthracen-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

150 mg (37 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 674 \text{ nm} (84.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ . - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 699 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 785.5 [M]<sup>+</sup>. - C<sub>42</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (807.95).

### 14. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 676

15 mg DY - 676, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

### 15. Synthese von DY - 731

180 mg (0.5 mmol) 2-*tert*-Butyl-7-diethylamino-4-methyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 307 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-3-methyl-2-(4-phenylaminobuta-1,3-dienyl)-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden in 50 ml Acetanhydrid gelöst und mit 1 ml Pyridin versetzt. Die Lösung wird bei ca. 140 °C ca. 30 min gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Der Rückstand wird in einer Mischung aus 10 ml Aceton und 10 ml 2-molarer Salzsäure 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt, die Reaktionslösung mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird chromatographiert (SiO<sub>2</sub>-RP-18, Eluent Methanol/ Wasser im Verhältnis 6:4).

120 mg (31 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 736 \text{ nm}$  ( $225.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 759 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>-</sup>): 739.2 [M]<sup>-</sup>, 369.5 [M - H]<sup>2-</sup>. - C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (762.92).

#### 16. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 731**

15 mg **DY - 731**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

#### 17. Synthese von **DY - 751**

206 mg (0.5 mmol) 2-*tert*-Butyl-8-ethyl-4,5,7,7-tetramethyl-7,8-dihydro-1-oxonia-8-aza-anthracen-tetrafluoroborat und 307 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-3-methyl-2-(4-phenyl-aminobuta-1,3-dienyl)-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 15 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

120 mg (29 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 751 \text{ nm}$  ( $220.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 779 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 793.1 [M + H]<sup>+</sup>, 419.4 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>, 408.4 [M + H + Na]<sup>2+</sup>, 397.4 [M + 2 H]<sup>2+</sup>. - C<sub>42</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (814.99).

#### 18. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 751**

15 mg **DY - 751**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

#### 19. Synthese von **DY - 776**

216 mg (0.5 mmol) 8-Ethyl-4,5,7,7-tetramethyl-2-phenyl-7,8-dihydro-1-oxonia-8-aza-anthracen-tetrafluoroborat und 307 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-3-methyl-2-(4-phenylamino-buta-1,3-dienyl)-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 15 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

110 mg (26 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 771 \text{ nm}$  ( $147.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 801 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 813.1 [M + H]<sup>+</sup>, 429.2 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>, 418.3 [M + H + Na]<sup>2+</sup>, 407.3 [M + 2 H]<sup>2+</sup>. - C<sub>44</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (834.98).

#### 20. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 776**

15 mg **DY - 776**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

## Ausführungsbeispiele 21 – 26 (Verbindungen der allgemeinen Formel II)

### 21. Synthese von DY - 681

180 mg (0.5 mmol) 4-*tert*-Butyl-7-diethylamino-2-methyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

140 mg (39 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 691 \text{ nm} (125.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ . - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 708 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 713.2 [M]<sup>+</sup>; 356.4 [M - H]<sup>2+</sup>. - C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (736.88).

### 22. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 681

15 mg DY - 681, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

### 23. Synthese von DY - 701

196 mg (0.5 mmol) 7-Diethylamino-2,3-dimethyl-4-phenyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 242 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 3 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

150 mg (39 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\max} (\epsilon) = 706 \text{ nm} (115.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ . - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}} = 731 \text{ nm}$ . - MS (ESI<sup>+</sup>): 747.2 [M]<sup>+</sup>; 373.4 [M-H]<sup>2+</sup>. - C<sub>39</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (770.90).

### 24. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von DY - 701

15 mg DY - 701, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

### 25. Synthese von DY - 781

180 mg (0.5 mmol) 4-*tert*-Butyl-7-diethylamino-2-methyl-chromenylium-tetrafluoroborat und 307 mg (0.5 mmol) 3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-3-methyl-2-(4-phenylaminobuta-1,3-dienyl)-5-sulfonato-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium Natriumsalz werden nach Ausführungsbeispiel 15 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.



125 mg (33 %) Ausbeute. - UV/Vis (Ethanol)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 783 nm (98.000 l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>). - Fluoreszenz  $\lambda_{\text{em}}$  = 800 nm. - MS (ESI<sup>+</sup>): 785.3 [M + Na]<sup>+</sup>; 763.3 [M + H]<sup>+</sup>; 404.4 [M + 2Na]<sup>2+</sup>; 393.5 [M + H + Na]<sup>2+</sup>. - C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Na (762.92).

## 26. Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters von **DY - 781**

15 mg **DY - 781**, 14 mg DCC und 4 mg NHS werden nach Ausführungsbeispiel 2 zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

Fig.: 1

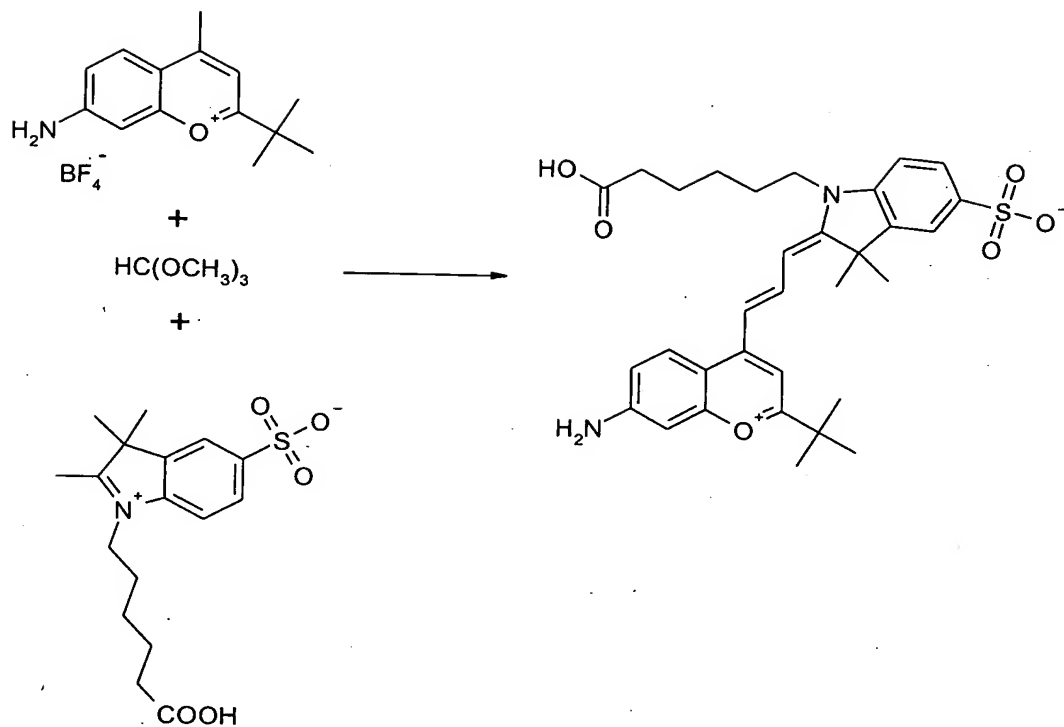


Fig.: 2

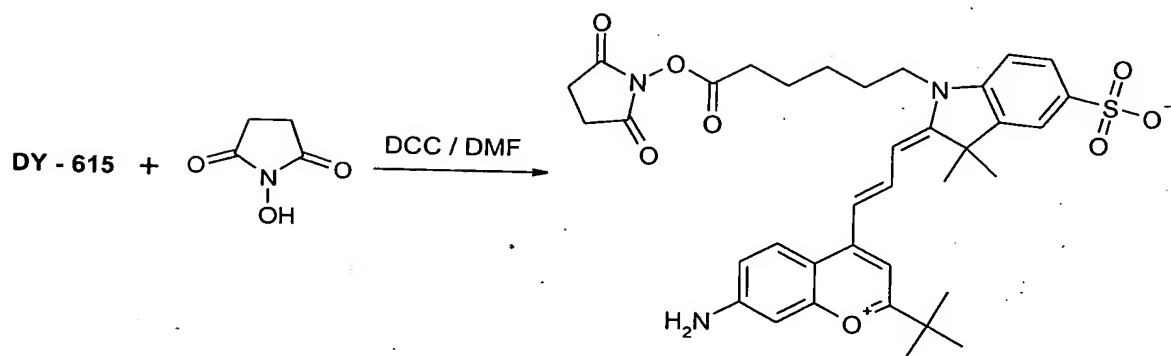


Fig.: 3

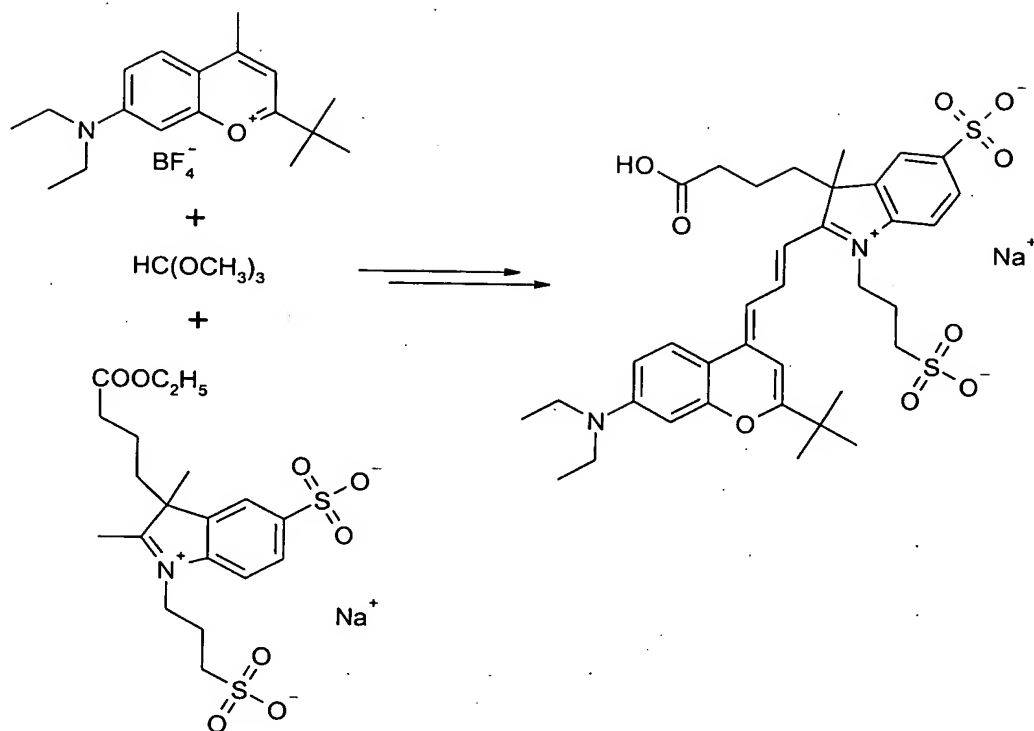


Fig.: 4

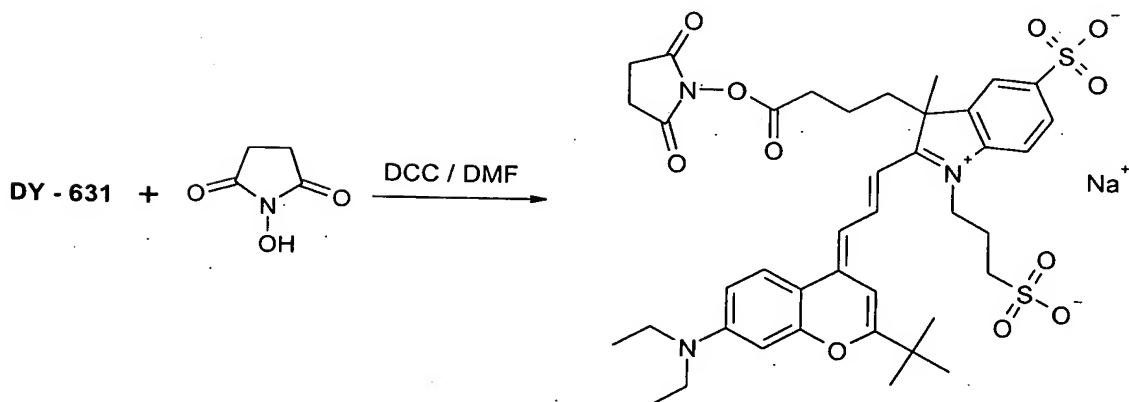


Fig.: 5

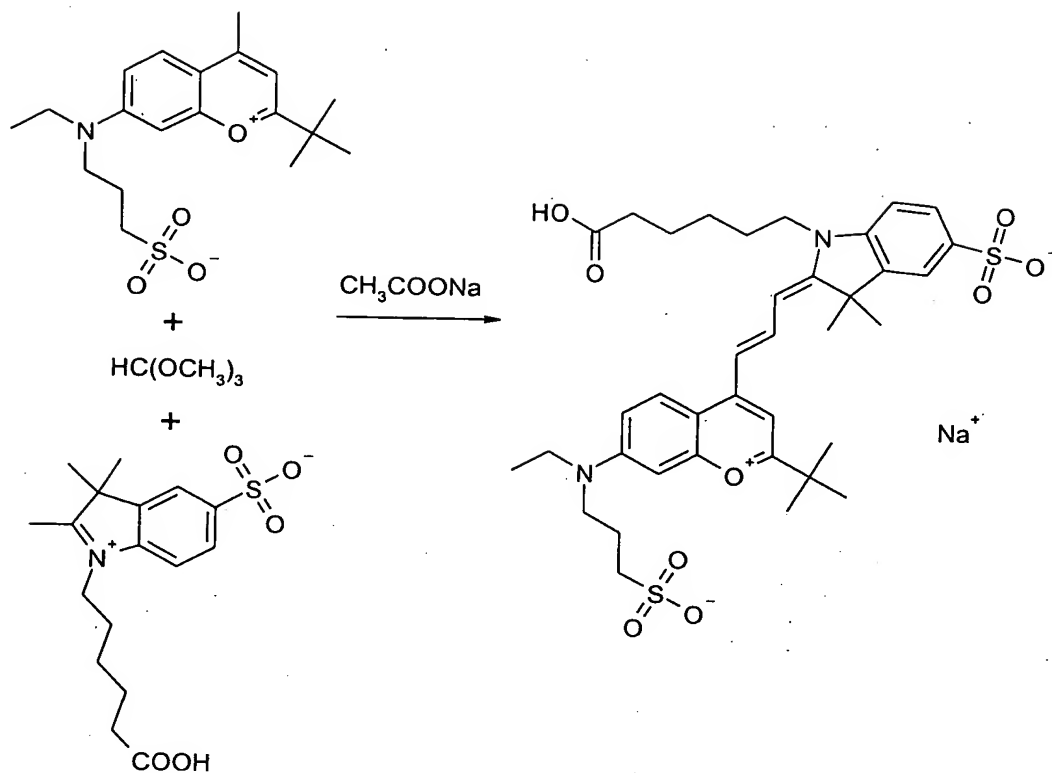


Fig.: 6

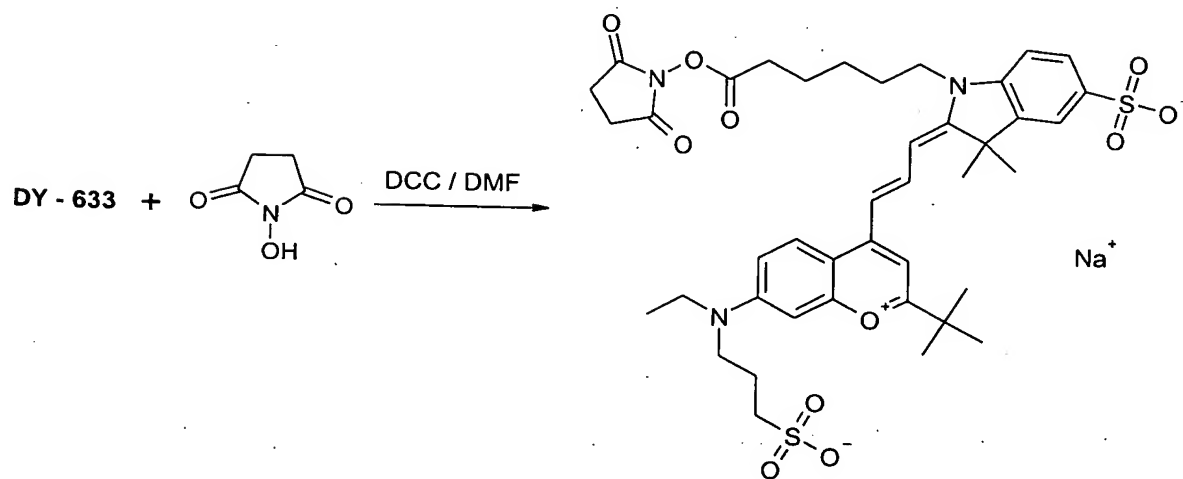


Fig.: 7

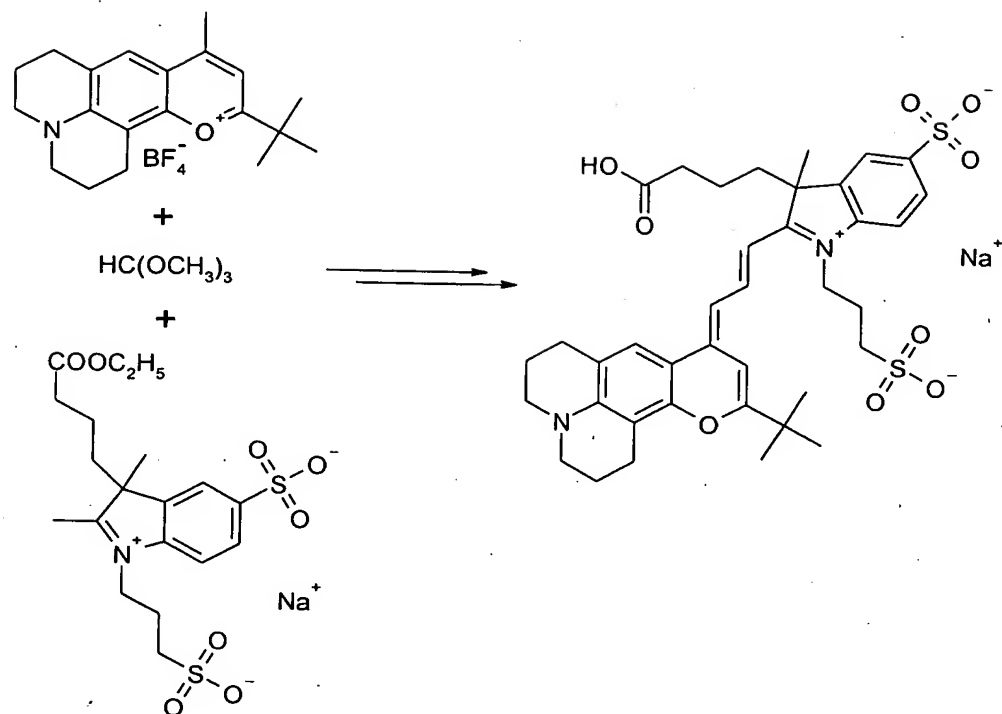


Fig.: 8

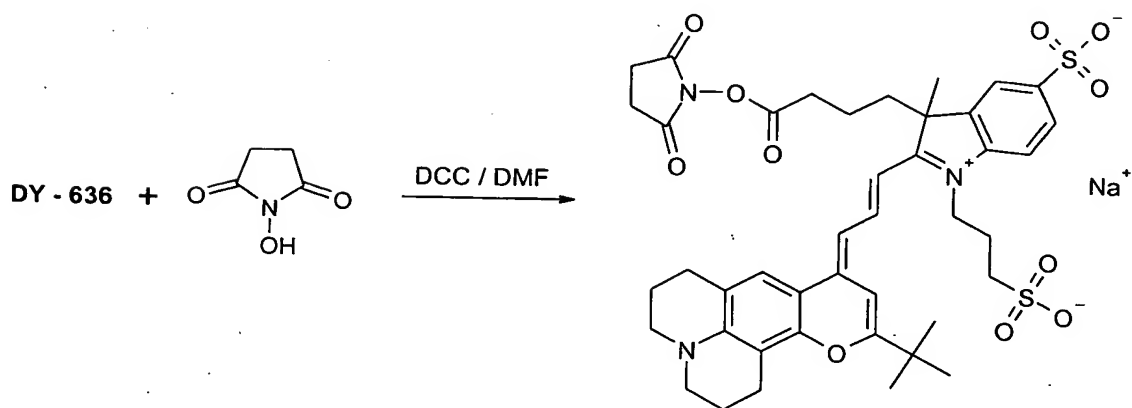


Fig.: 9

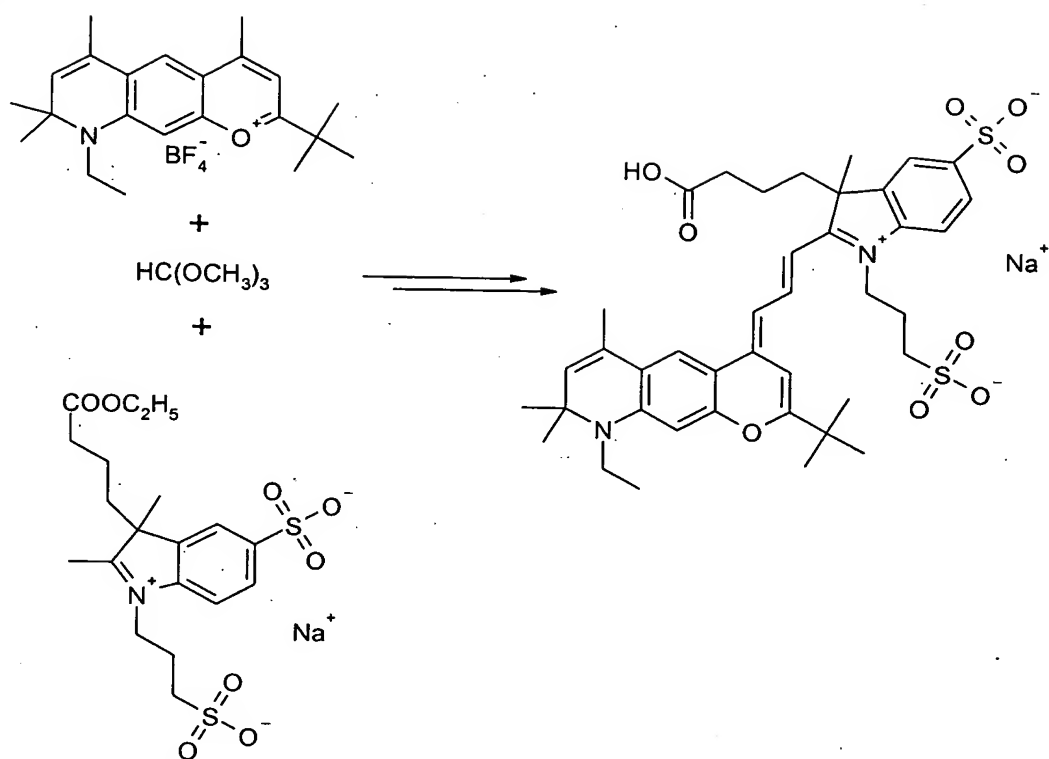


Fig.: 10

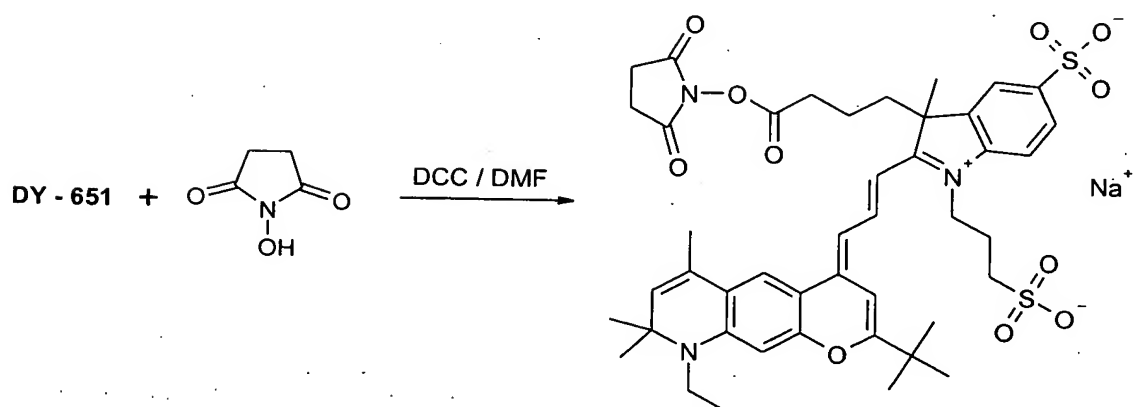


Fig.: 11

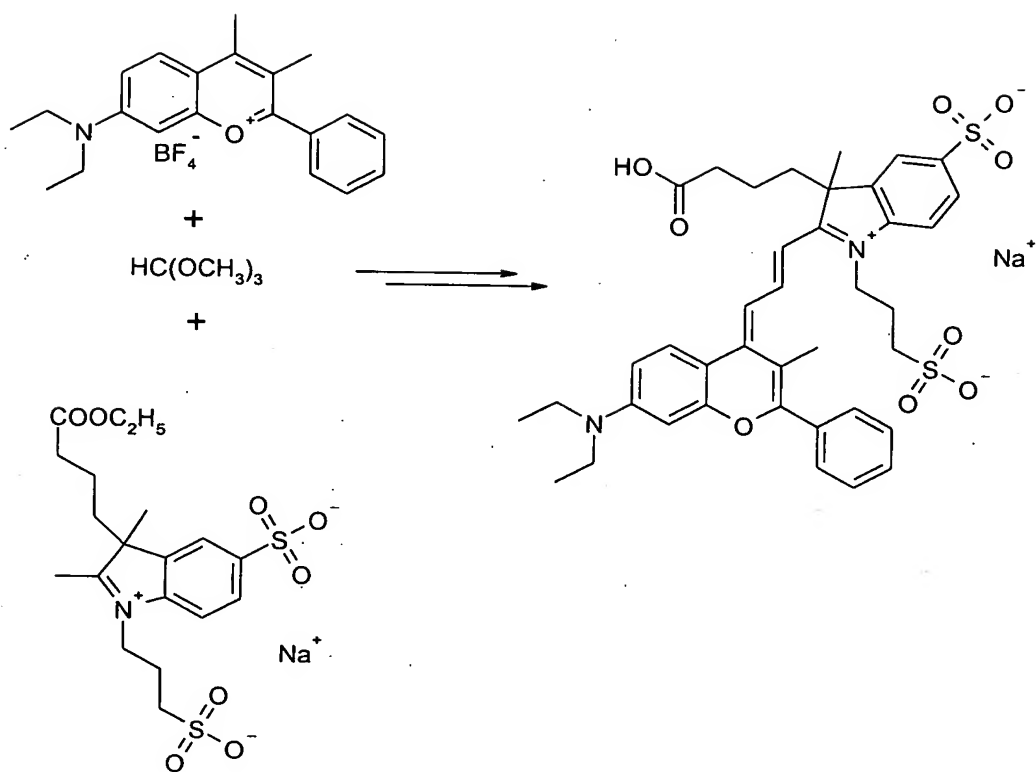


Fig.: 12

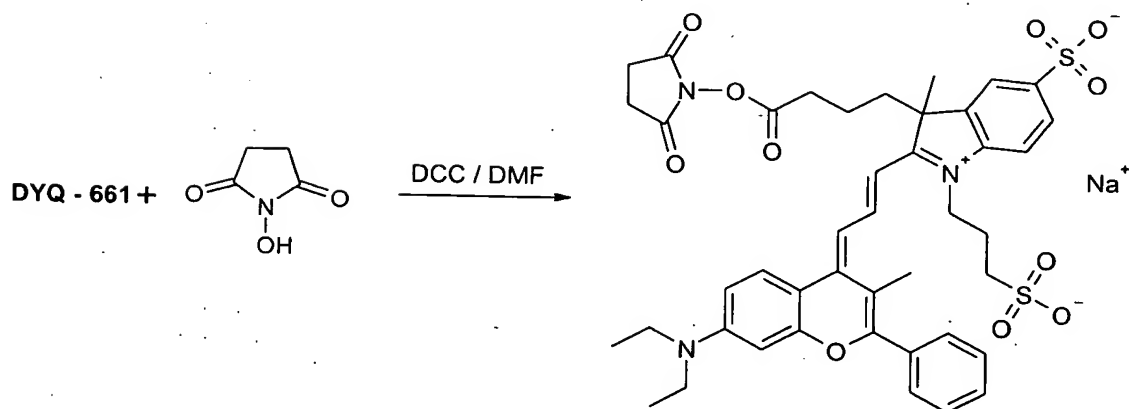


Fig.: 13

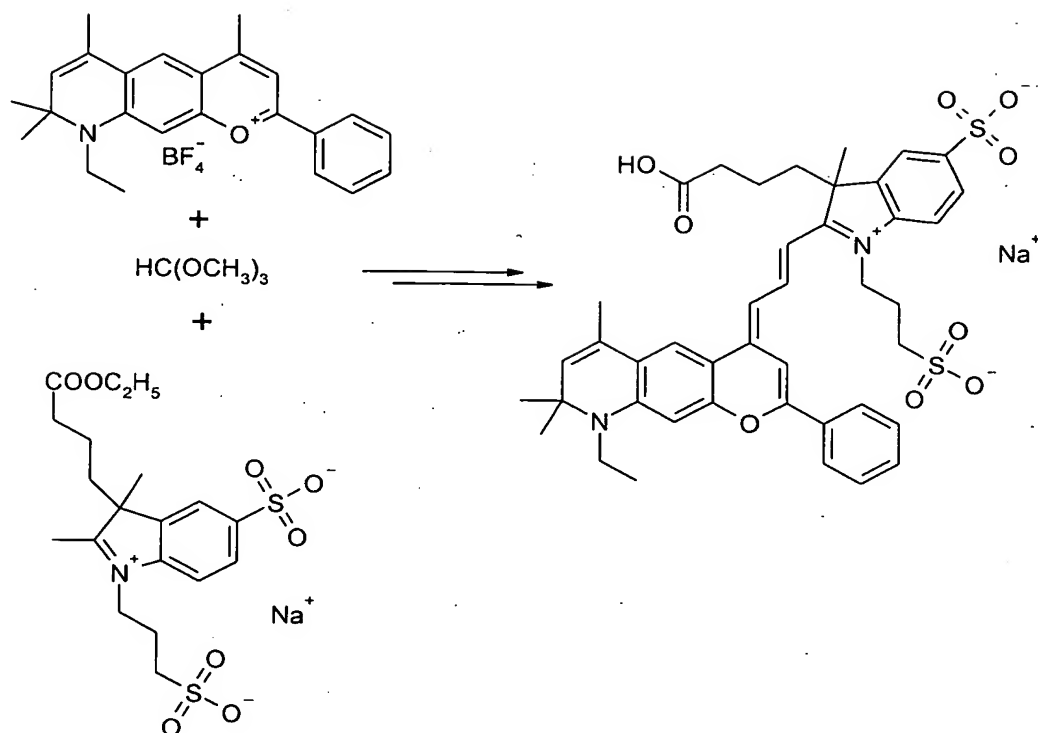


Fig.: 14

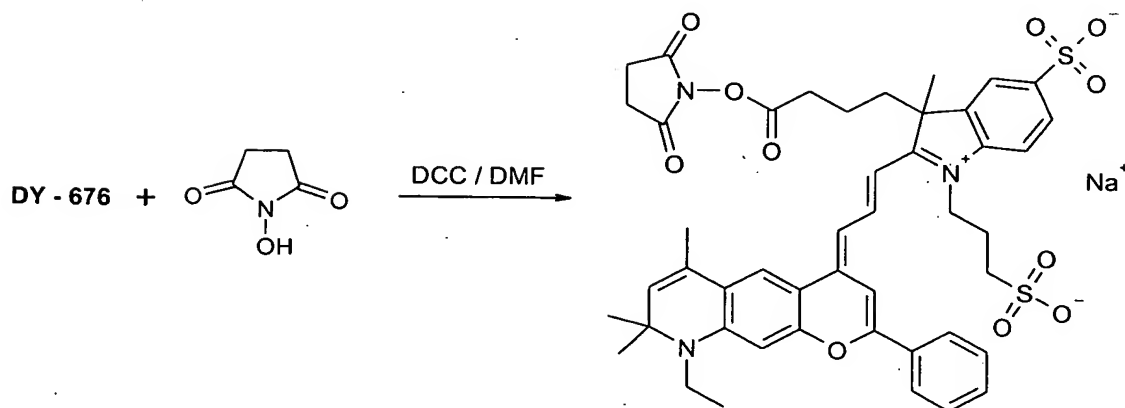




Fig.: 15

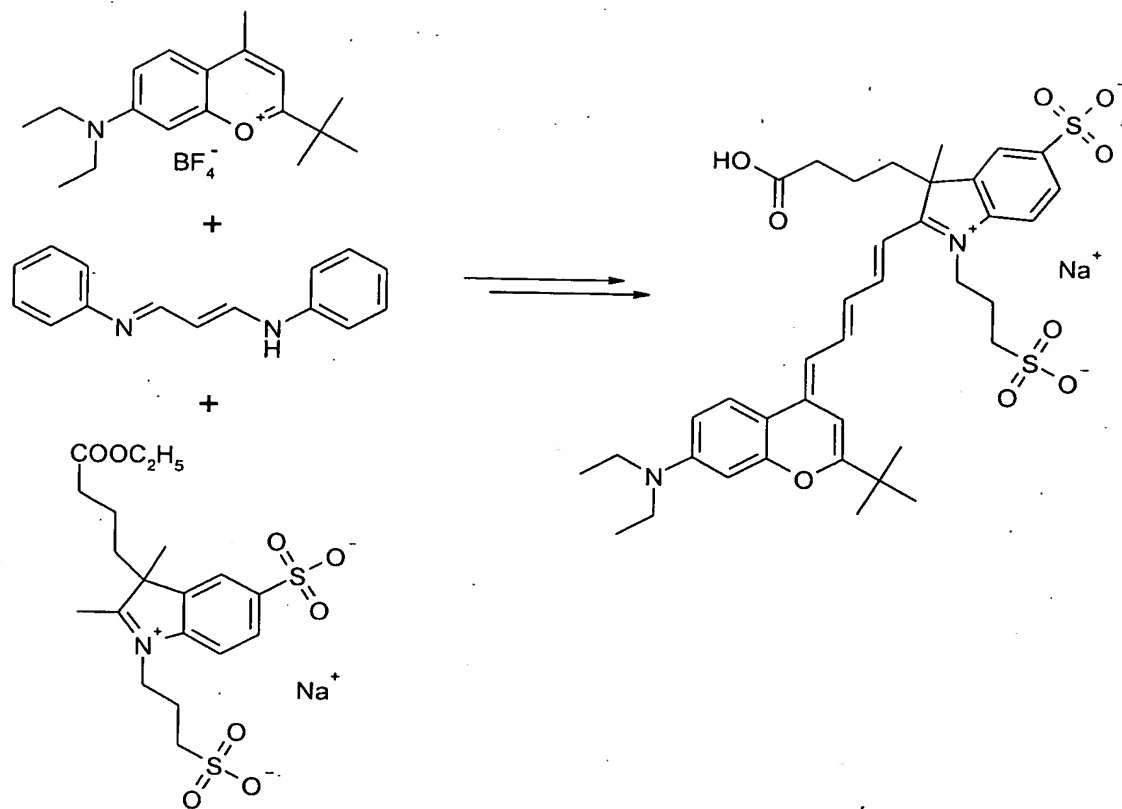


Fig.: 16

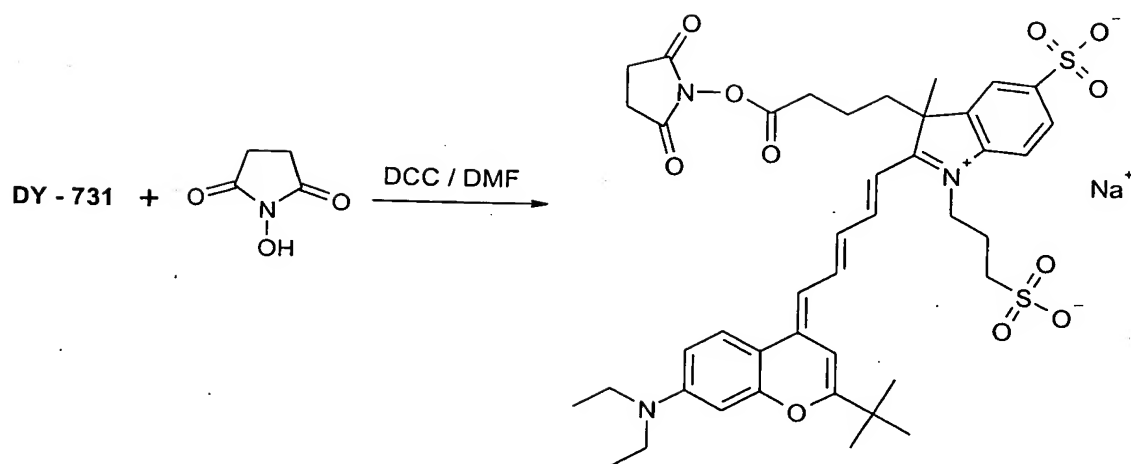


Fig.: 17

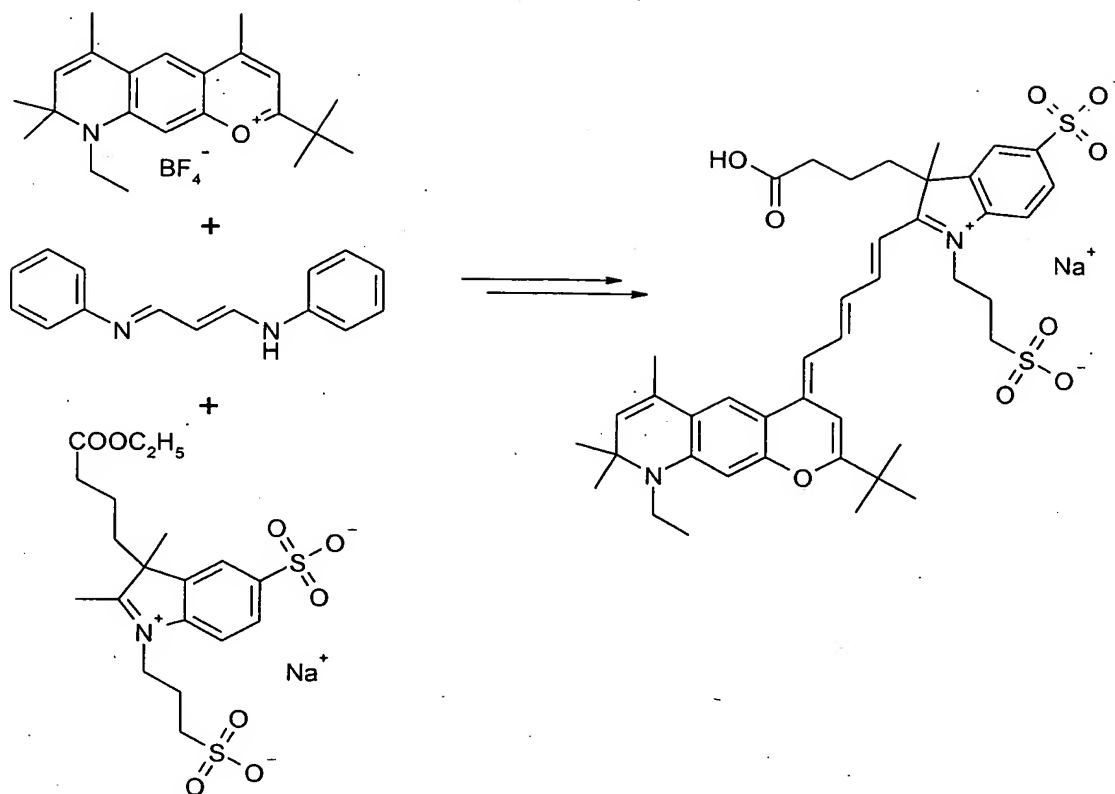


Fig.: 18

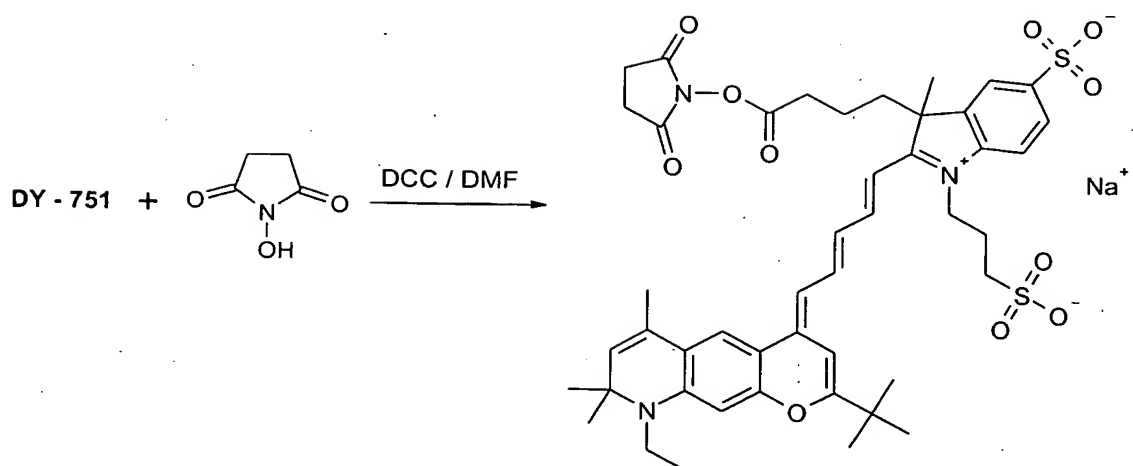


Fig.: 19

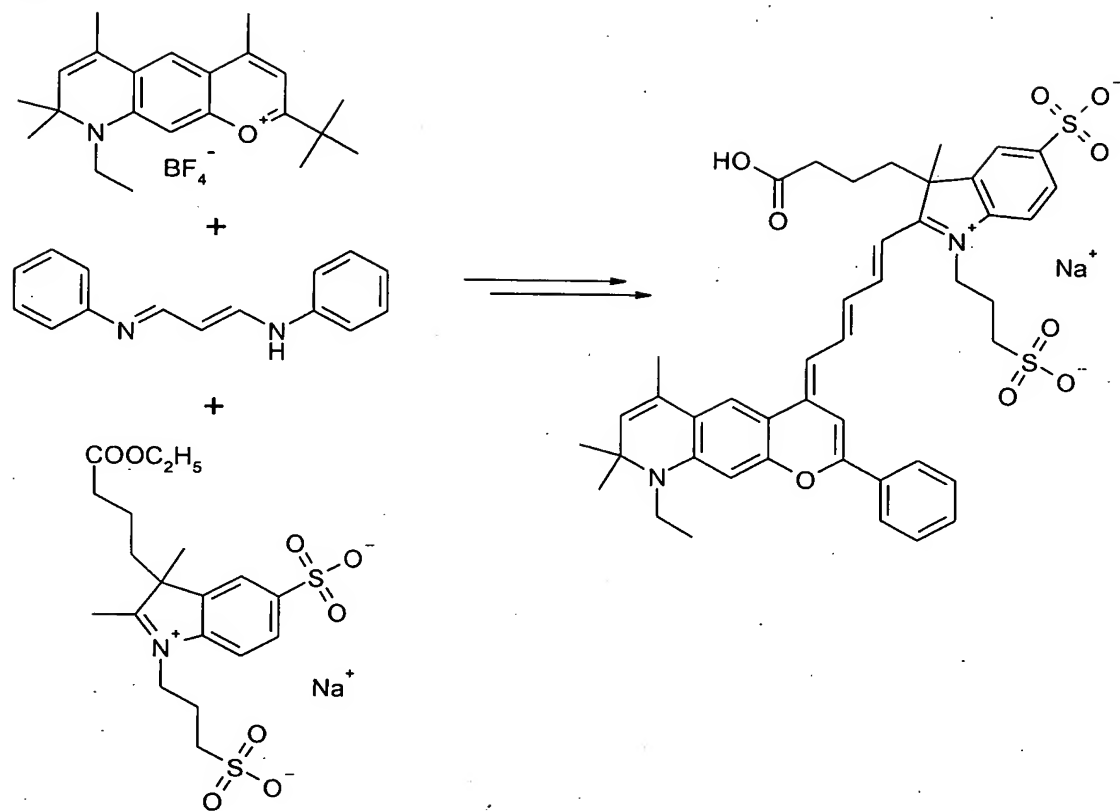


Fig.: 20

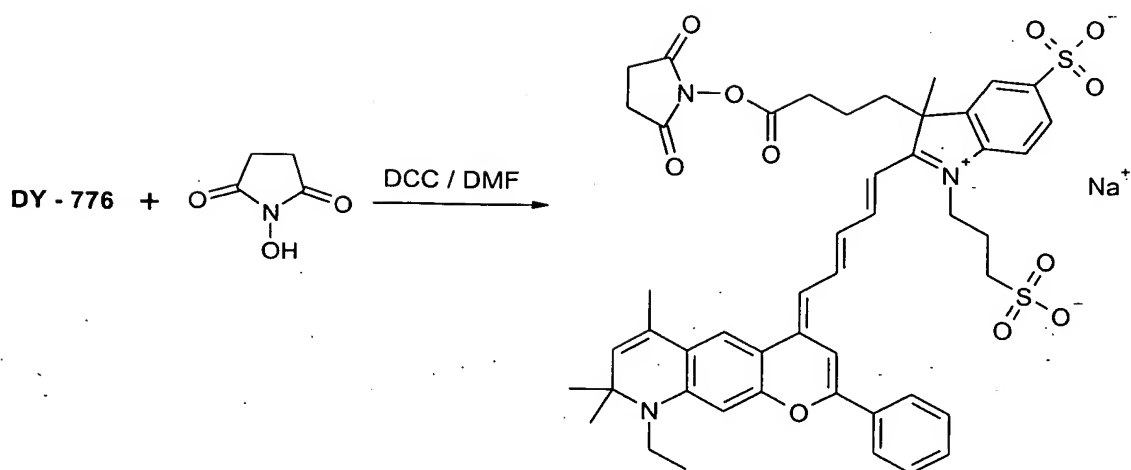


Fig.: 21

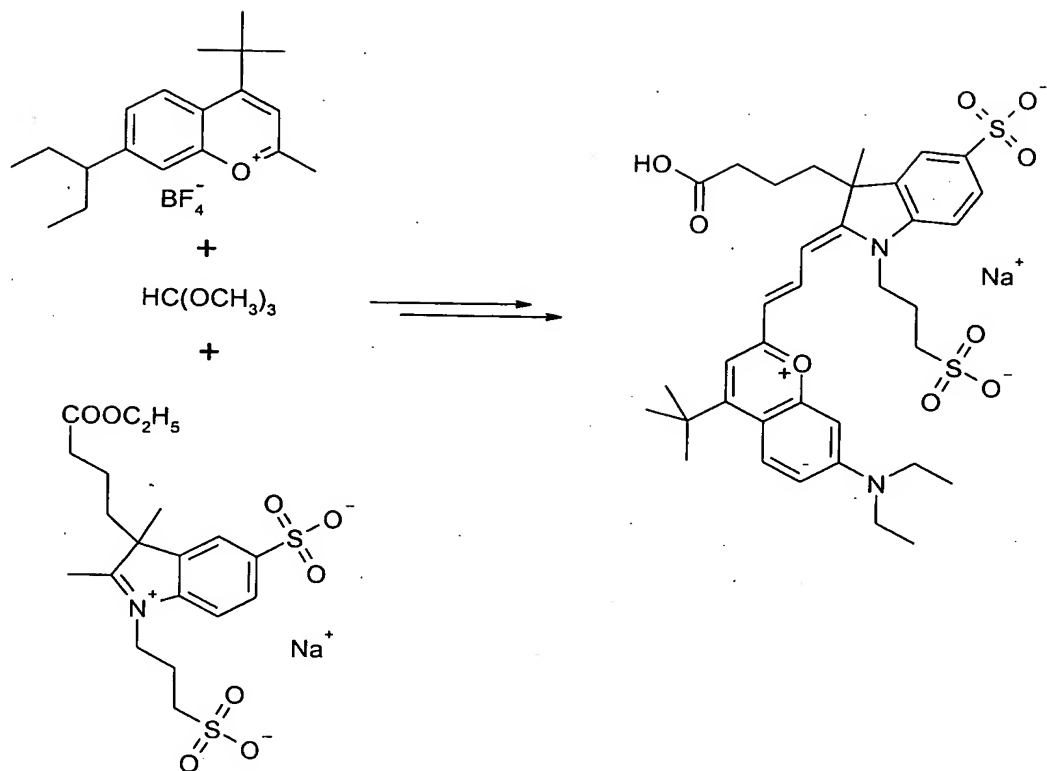


Fig.: 22

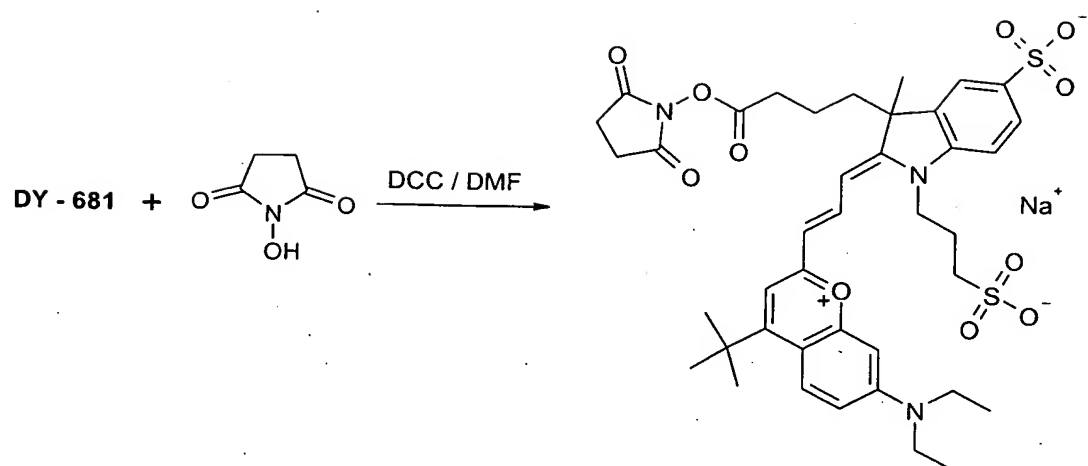


Fig.: 23

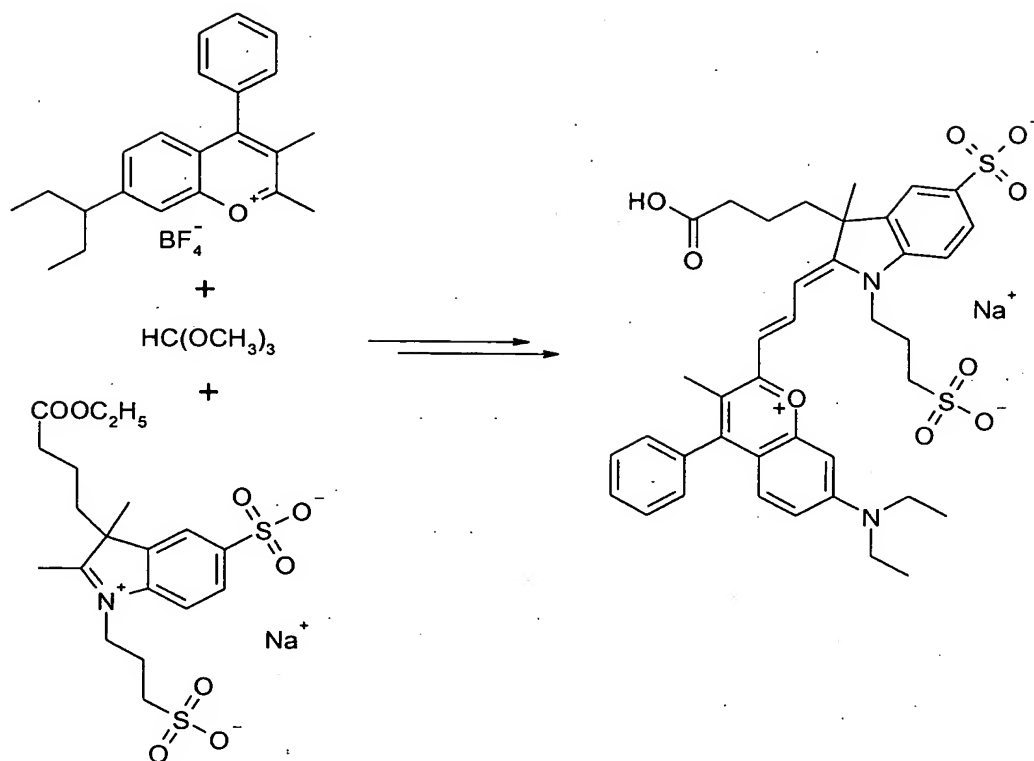


Fig.: 24

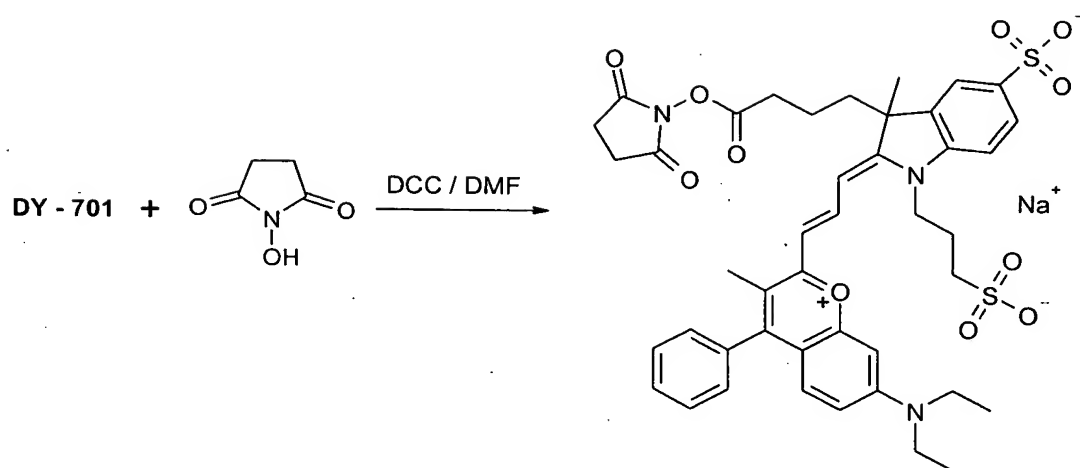


Fig.: 25

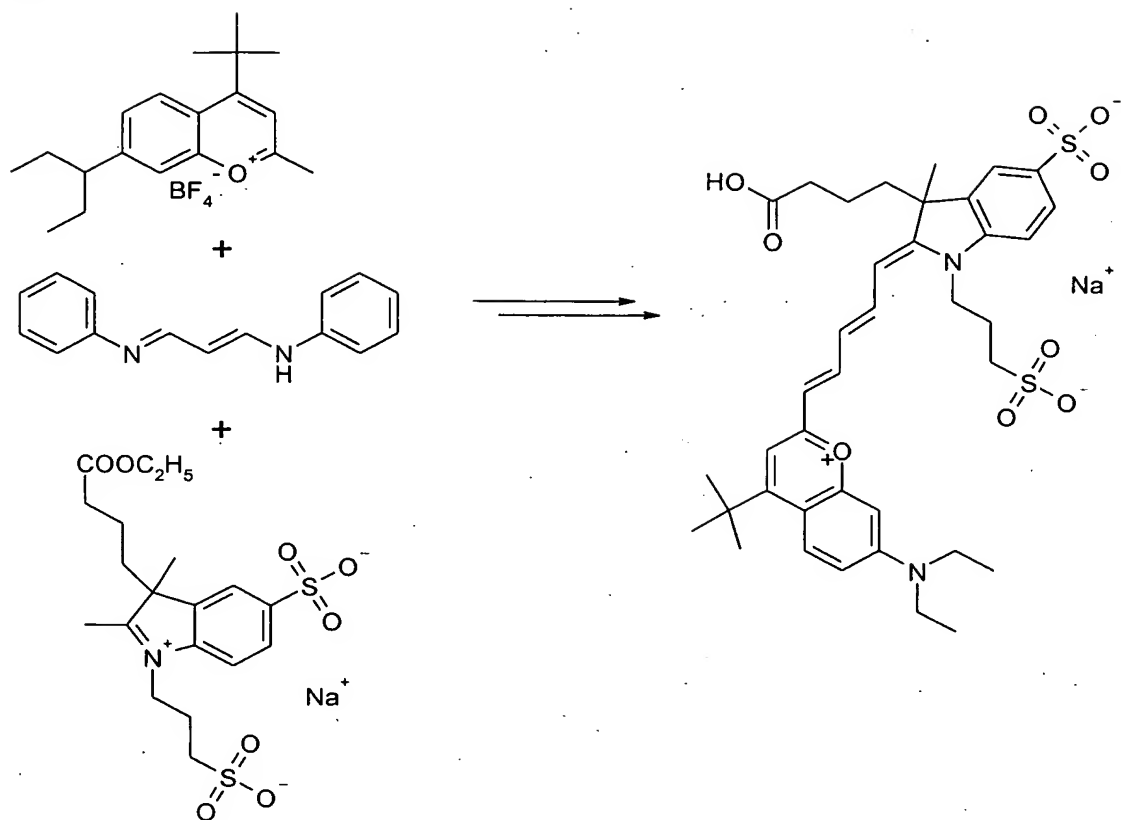
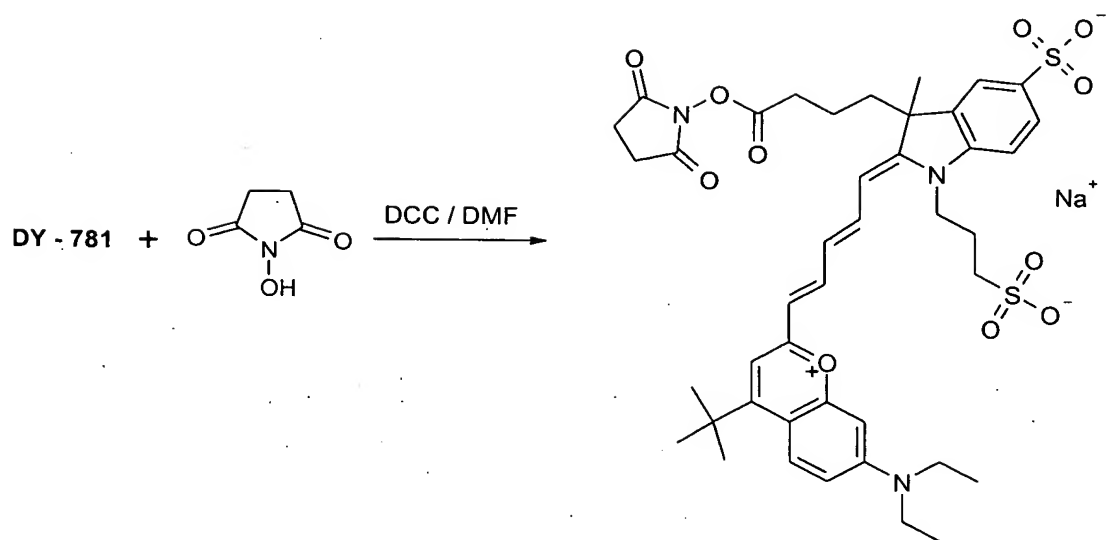
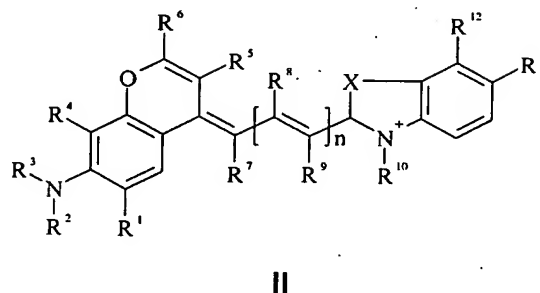
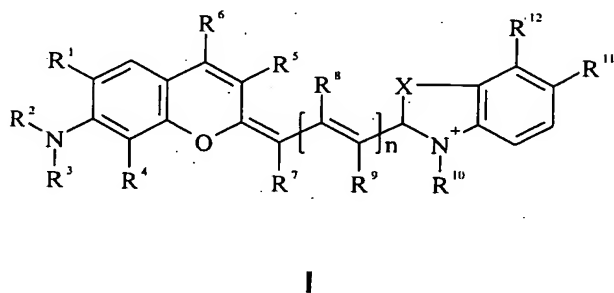


Fig.: 26



## Patentansprüche

1. Hydrophile Marker auf der Basis von unsymmetrischen Polymethinen der allgemeinen Struktur I bzw. II



wobei

- X für ein Element aus der Gruppe O, S, Se, Te bzw. das Strukturelement  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{13}\text{R}^{14}$  und n für die Zahlenwerte 0, 1, 2 oder 3 steht, wobei die für  $n = 2$  oder 3 jeweilig doppelt oder dreifach vorkommenden Substituenten  $\text{R}^8$  und  $\text{R}^9$  gleich oder unterschiedlich sein können, steht,
- $\text{R}^1 - \text{R}^{14}$  gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, Alkyl-, *tert*-Alkyl-, Aryl-, Carboxyaryl-, Dicarboxyaryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Alkyloxy-, Alkylmercapto- (wobei die Begriffe Alkyl und Cycloalkyl auch Reste mit olefinischen Bindungen einschließen sollen), Aryloxy-, Arylmercapto-, Heteroaryloxy-, Heteroarylmercapto-, Hydroxy-, Nitro- oder Cyano-Reste sein können und  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^9$  und  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{R}^{11}$  und  $\text{R}^{12}$  bzw.  $\text{R}^{12}$  und  $\text{R}^{13}$  einen oder mehrere aliphatische, heteroaliphatische oder aromatische Ringe bilden können,
- mindestens einer der Substituenten  $\text{R}^1 - \text{R}^{14}$  solubilisierende bzw. ionisierbare bzw. ionisierte Substituenten wie  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ , OH,  $\text{NR}_3^+$ , Cyclodextrin oder Zucker darstellen können, die die hydrophilen Eigenschaften der Farbstoffe bestimmen, wobei diese Substituenten auch über eine aliphatische oder heteroaliphatische, gegebenenfalls zyklische Spacergruppe am eigentlichen Grundchromophor angebunden sein können,

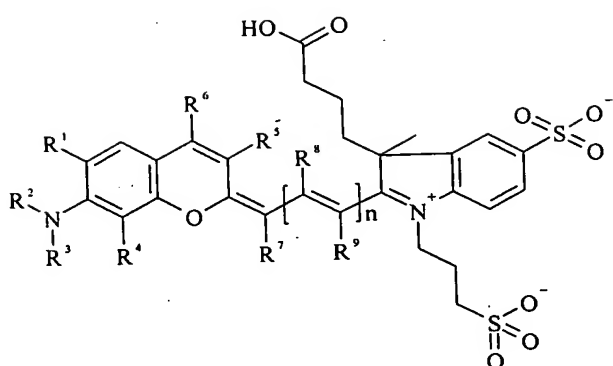
- mindestens einer der Substituenten  $R^1 - R^{14}$  für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit einem anderen Molekül ermöglicht, wobei dieser Substituent auch über eine Spacerfunktion am Markerfarbstoff angebunden sein kann, und
- $R^6$  einen Substituenten darstellt, der in  $\alpha$ -Position zum Pyranring ein quartäres oder  $sp^2$ -hybridisiertes C-Atom aufweist, wobei die Substituenten  $R^6$  und  $R^5$  auch ein aliphatisches bzw. substituiertes aliphatisches oder aromatisches Ringsystem bilden können.

2. Hydrophile Marker gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe aus folgenden Funktionalitäten ausgewählt ist: Isocyanate, Isothiocyanate, Hydrazine, Amine, Mono- und Dichlor- bzw. Mono- und Dibromtriazine, Aziridine, Sulfonylhalogenide, *N*-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd für Amin- und Hydroxy-Funktionen bzw. Maleimide oder Iodacetamide für Thiol-Funktionen sowie Phosphoramidite für die Markierung von DNA oder RNA oder deren Bruchstücke.

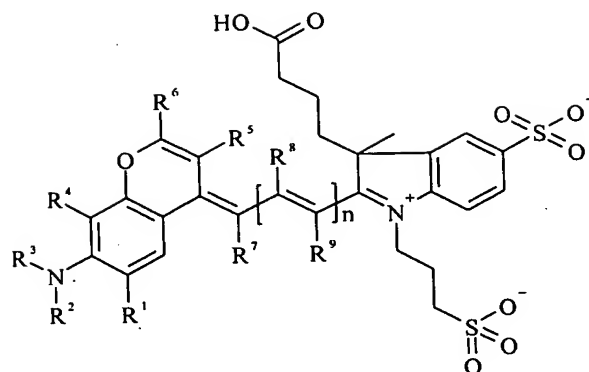
3. Hydrophile Marker gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe über aliphatische oder heteroaliphatische Spacergruppe die aus einem Strukturelement  $-[(CH_2)_a-Y-(CH_2)_b]_c-$  besteht, worin Y gleich oder verschieden eine  $CR_2$ -, O-, S-,  $SO_2$ ,  $SO_2NH$ -, NR-, COO- oder CONR- Funktion sein kann, wobei R die Funktionen von  $R^1 - R^{14}$  einnehmen kann und a und b gleich oder verschieden die Werte von 0 - 18 und c die Werte von 1- 18 darstellen, am eigentlichen Chromophor gebunden ist.

4. Hydrophile Marker gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten  $R^{10} - R^{12}$  und X mit  $CR^{13}R^{14}$  die folgende Bedeutung in der Struktur Ia bzw. IIa besitzen.





Ia



IIa

5. Verwendung der hydrophilen Marker nach den Ansprüchen 1 – 4 als Farbstoffe zur optischen Markierung von Aminosäuren, Proteinen, Antikörpern, Nucleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren einschließlich Immuntests, Hybridisierungsverfahren, FRET-Systemen, chromatographischer oder elektrophoretischer Verfahren und des Hoch-Durchsatz-Screenings.

6. Systeme zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von Aminosäuren, Proteinen, Antikörpern, Nucleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Gruppen der Verbindungen nach Anspruch 1 – 4 kovalent an eine HO-, H<sub>2</sub>N-, oder HS-Funktion der zu bestimmenden Substanz gekoppelt werden.

7. Systeme nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungsreaktion in wässrigen Lösungen durchgeführt wird.